

« بسمه تعالی »



دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ دکتری حرفه ای در رشته پزشکی

عنوان پایان نامه :

اثر رتینوئیک اسید بر بقا سلولی و بیان ژنهای **hes1** , **notch1** در

سلول های سرطان معده رده ی سلولی **MKN-45**

استاد راهنما:

دکتر علی نیاپور

دکتر مجتبی امانی

استاد مشاور:

دکتر محمد قاسم گل محمدی

نگارش:

سمیرا شکری

سال تحصیلی ۹۵-۹۴

شماره پایان نامه: ۰۵۳۷



تقدیم به

تقدیم به پدر بزرگوارم

به پاس رنج سالیان

به او که سالار لحظه لحظه های زندگی من بود

تقدیم به مادر عزیزتر از جان و مهربانم

او که شانه هایش تکیه گاه امن بودنم

و آغوشش اعتبار سبز ماندنم می باشد

تقدیم به برادر و خواهران عزیزم

شریک تلخ ترین و شیرین ترین خاطراتم

که حضورشان شادی بخش لحظه هایم است

تقدیر و سپاس

حمد و سپاس پروردگار عالم را کہ به یمن عنایت خویش و لطف عزیزان توفیق یافتم این مجموعه را

تقدیم به مشتاقان و علاقه مندان به علم و دانش نمایم.

بر خود واجب می دانم از زحمات اساتید راهنما جناب آقای دکتر نیاپور و جناب آقای دکتر امانی و

استاد مشاور جناب آقای دکتر گلمحمدی که با رهنمود های ارزشمند در به ثمر رساندن پایان نامه مرا

یاری فرمودند کمال تشکر و سپاسگزاری را داشته باشم.

همچنین از از زحمات اساتید محترم داور جناب آقای دکتر نجف زاده، جناب آقای دکتر مازنی و جناب

آقای دکتر محمدی که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند کمال قدردانی را داشته باشم.

و در نهایت از همه دوستان عزیزم که در این مدت مانند خواهری مهربان شریک تلخ ترین و شیرین

ترین لحظات زندگی من شدند، سرکار خانم دکترها فاطمه شکری، زهره عبدالرحیمی، فاطمه معصومی

و ثمر فتاح زاده بسیار متشکرم

فصل اول: مقدمه و بیان مساله

عنوان	صفحه
۱-۱ مقدمه.....	۲
۲-۱ تعریف واژگان کلیدی.....	۶
۳-۱ اهداف.....	۷

فصل دوم: پیشینه تحقیق

۱-۲ بیولوژی سرطان.....	۱۰
۲-۲ پروتئانکوژن ها.....	۱۲
۳-۲ مرگ برنامه ریزی شده سلول.....	۱۲
۴-۲ سلول های بنیادی سرطان.....	۱۳
۵-۲ تاریخچه سلول های بنیادی سرطان.....	۱۳
۶-۲ آدنوکارسینوم معده.....	۱۴
۱-۶-۲ اپیدمیولوژی.....	۱۴
۲-۶-۲ پاتولوژی.....	۱۵
۳-۶-۲ اتیولوژی.....	۱۶
۴-۶-۲ مورفولوژی.....	۱۸
۵-۶-۲ تظاهرات بالینی.....	۲۰

۲۱.....	۶-۶-۲ تشخیص
۲۲.....	۷-۶-۲ درمان
۲۳.....	۷-۲ رتینوئیک اسید
۲۴.....	۱-۷-۲ مسیر پیام رسانی رتینوئیک اسید
۲۷.....	۸-۲ رتینوئیک اسید و سرطان
۲۹.....	۹-۲ مسیر پیام رسان notch
۳۰.....	۱-۹-۲ notch و سلول های بنیادی
۳۰.....	۲-۹-۲ notch در تکثیر و تمایز
۳۱.....	۳-۹-۲ ساختار رسپتورها و لیگاند های notch
۳۲.....	۴-۹-۲ فعالسازی مسیر notch
۳۳.....	۵-۹-۲ وقایع هسته ای مسیر notch
۳۴.....	۶-۹-۲ notch و سرطان
۳۵.....	۷-۹-۲ notch و سرطان معده
۳۶.....	۸-۹-۲ مورد هدف قرار دادن notch به عنوان یک روش درمانی
۳۷.....	۱۰-۲ مطالعات گذشته

فصل سوم: شیوه اجرای تحقیق

۴۱.....	۱-۳ مواد و تجهیزات مورد استفاده
---------	---------------------------------

۴۱	۳-۱-۱ مواد مورد استفاده.....
۴۲	۳-۱-۲ ظروف و مواد مصرفی.....
۴۲	۳-۱-۳ تجهیزات مورد استفاده.....
۴۶	۳-۲ اطلاعات مربوط به متدولوژی پایان نامه.....
۴۶	۳-۲-۱ جدول متغیرها.....
۴۶	۳-۲-۲ نوع مطالعه.....
۴۷	۳-۲-۳ جامعه آماری و روش حجم نمونه.....
۴۷	۳-۲-۴ زمان و مکان مطالعه.....
۴۷	۳-۲-۵ ملاحظات اخلاقی.....
۴۷	۳-۳ روش انجام کار.....
۴۷	۳-۳-۱ تهیه رده سلولی.....
۴۷	۳-۳-۲ ذوب کردن ویال حاوی سلول.....
۴۸	۳-۳-۳ تعویض محیط کشت.....
۴۹	۳-۳-۴ پاساژ سلولی.....
۵۰	۳-۳-۵ منجمد کردن سلول ها.....
۵۱	۳-۳-۶ شمارش سلولی به روش Trypan blue dye exclusion
۵۲	۳-۳-۷ تیمار سلول های سرطانی معده با غلظت های مختلف ATRA
۵۳	۳-۴ روش انجام فلوسیتومتری.....
۵۳	۳-۵ بررسی فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ در روند آپوپتوز.....

۵۷.....	۶-۳ استخراج RNA
۵۸.....	۱-۶-۳ تعیین غلظت RNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ
۵۹.....	۳-۶-۲ سنتز cDNA از RNA استخراج شده
۶۱.....	۳-۶-۳ RT-PCR
۶۴.....	۷-۳ تجزیه و تحلیل داده ها

فصل چهارم: یافته های پژوهش

۶۶.....	۱-۴ تاثیر غلظت های مختلف اسید رتینوئیک تمام ترانس (ATRA) بر میزان حیات سلول های سرطانی معده از رده MKN-45
۶۸.....	۲-۴ بررسی میزان آپوپتوز با استفاده از کیت Caspase-Glo3/7
۷۰.....	۳-۴ تاثیر ATRA روی روند چرخه سلولی در سلول های MKN-45
۷۲.....	۴-۴ بررسی بیان ژن های مسیر Notch با استفاده از تکنیک RT-PCR

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۷۴.....	۱-۵ بحث
۷۸.....	۲-۵ نتیجه گیری
۷۸.....	۳-۵ محدودیت ها
۷۸.....	۴-۵ پیشنهادات
۸۰.....	۵-۵ منابع

فهرست جداول و نمودارها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۲ فاکتورهای خطر ساز کارسینوم معده.....	۱۷
جدول ۱-۳ نام و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش های RT-PCR	۶۱
جدول ۲-۳ برنامه دمایی و زمانی مراحل واکنش RT-PCR	۶۲
نمودار ۱-۴ میزان حیات سلول های MKN-45 در غلظت های مختلف ATRA با روش MTT.....	۶۷
نمودار ۲-۴ میزان آپوپتوز با استفاده از کیت Caspase-Glo 3/7	۶۹
نمودار ۳-۴ تاثیر ATRA بر روند تغییرات چرخه سلولی در سلول های سرطانی معده رده MKN-45	۷۱
نمودار ۴-۴ الگوی بیان ژنی مربوط به ژن های notch1 و hes1 به روش RT-PCR	۷۲

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۲ ساختار رتینوئیک اسید تمام ترانس.....	۲۴
شکل ۲-۲ نحوه فعالسازی و عملکرد هتروداایمرهای RAR/RXR	۲۷
شکل ۳-۲ دوگانگی عملکرد notch در سرطان.....	۳۵
شکل ۱-۳ برخی از تجهیزات مورد استفاده.....	۴۵
شکل ۲-۳ نمایی از هموسایتومتر و نحوه شمارش سلول ها در این سیستم.....	۵۲
شکل ۳-۳ نحوه برهم کنش سوپسترا در کیت.....	۵۴
شکل ۴-۳ شکل شماتیک نشان دهنده روش کار کیت.....	۵۶

تأثیر اسید رتینوئیک تمام ترانس بر بقا سلولی و بیان ژن های **hes1** و **notch1** در سلول های

سرطان معده رده MKN-45

چکیده

مقدمه: سرطان معده یکی از شایع ترین سرطان های جهان و دارای بالاترین میزان مرگ و میرهای مربوط به سرطان می باشد. رتینوئیک اسید و مشتقات آن به دلیل داشتن ویژگی های ضد تکثیری، آنتی اکسیدانی، پروآپتوتیک و اثر تمایزی به عنوان یک ماده شیمی درمانی و Chemopreventive بالقوه مورد استفاده قرار می گیرند. رتینوئیک اسید تمام ترانس (ATRA) به عنوان یک داروی تایید شده برای درمان بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوتیک حاد (APL) استفاده می شود. مسیر پیام رسانی سلولی notch نقش مهمی در حفظ تعادل میان تکثیر سلولی و آپوپتوز ایفا می کند. فعالیت نابجای این مسیر در توسعه و پیشرفت بسیاری از بدخیمی ها از جمله سرطان معده نقش دارد. در این تحقیق اثرات ATRA بر بقا سلول، تغییرات چرخه سلولی و همچنین آپوپتوز سلول های سرطانی معده رده سلولی MKN-45 بررسی شده و اثرات احتمالی آن بر بیان برخی از ژن های مسیر پیام رسان Notch مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه سلول های سرطانی معده رده MKN-45 با غلظت های مختلف (۲.۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ میکرومولار) از رتینوئیک اسید تمام ترانس تیمار شدند و بقا سلولی با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر آپوتوتیک ATRA از طریق سنجش میزان فعالیت آنزیم های کاسپاز ۳ و ۷ مورد بررسی قرار گرفت. به کمک تکنیک فلوسیتومتری و با استفاده از رنگ آمیزی DAPI روند

تغییرات چرخه سلولی بررسی شد. در نهایت، پروفایل بیان ژن های *hes1* و *notch1* در گروه تیمار با ATRA و کنترل بوسیله RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: یافته های MTT حاکی از کاهش میزان بقا سلول های سرطانی MKN-45 به دنبال تیمار با رتینوئیک اسید بود. بیشترین تاثیر ATRA در غلظت ۱۰ میکرومولار مشاهده شد. تفاوت معنی داری بین غلظت های ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار با غلظت ۱۰ میکرومولار وجود ندارد. تیمار سلول های سرطانی با ATRA سبب افزایش معنی دار فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ در این سلول ها شد. نتایج فلوسایتومتری نشان دهنده توقف معنی دار چرخه سلولی در مرحله G1 در گروه دریافت کننده ATRA بود. همچنین، نتایج RT-PCR نشان دادند که میزان بیان ژن *notch1* کاهش معنی داری را در گروه تیمار با ATRA در مقایسه با گروه کنترل دارد.

نتیجه گیری: طبق نتایج این مطالعه مشخص شد که ATRA اثر سمیت خود را از طریق کاهش میزان حیات سلولی و القای آپوپتوز در رده MKN-45 اعمال می نماید. کاهش بیان ژن *Notch1* و شیفت چرخه سلولی از G2M به مرحله G1 می تواند تاییدی بر اثرات ضد تکثیری ATRA دانست.

کلمات کلیدی: سرطان معده، ATRA، آپوپتوز، مسیر پیام رسانی *notch*

فهرست اختصارات

Abbreviation

ADAM: A Desintegrine And Metallopeptidase

APL: Acute Promyelocytic Leukemia

ATRA: All-Trans Retinoic Acid

Caspase: Cystein-dependent Aspartat Specific Proteas

CD: Cluster Determine

cDNA :complementary DeoxyRiboNucleic Acid

COX-2: Cyclooxygenase-2

DNA: DeoxyRiboNucleic Acid

GSI: Gamma Secretase Inhibitor

HDAC: Histone deacetylases

NcoR: Nuclear ci-Receptor

NECD: Notch Extracellular Domain

NICD: Notch Intracellular Domain

NRR: Negative Regulatory region

RAER: Retinoic Acid Elements Response

RAR: Retinoic Acid Receptor

RARE: Retinoic Acid Receptor Element

RT-PCR: Reverse transcription-Polymerization Chain Reaction

RXR: Retinoic X Receptor

SMRT: Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptor

TD: Transmembrane Domain